

제품번호: AGTC-PB05-100 (Ver. 3.0) (100 rxn)

제조날짜: 20XX. XX. XX.

로트번호: XXXXXX-PB05-100

유효기일: 20XX. XX. XX.

1. 설명

AquaAmp® Fish META Universal PCR Kit II는 연골어류와 경골어류의 DNA 메타바코딩(metabarcoding) 영역인 미토콘드리아 16S 리보솜 RNA 유전자(이하 '16S rDNA') 영역의 PCR 증폭반응을 수행하는데 필요한 PCR 프라이머 조합과 일체의 PCR 증폭반응액 성분을 포함하는 분석키트이다.

2. 보관

이 분석키트를 냉동보관하면(-20°C) 1년 이상 활성이 안정적으로 유지된다. 구성성분의 반복적인 녹임과 얼림은 그 활성을 떨어트리는 주요한 원인이 된다.

3. 활용

이 분석키트는 환경수 안에 남아있는 환경 DNA (environmental DNA)(이하 'eDNA')를 대상으로 미토콘드리아 16S rDNA 영역의 DNA 메타바코딩을 수행하여 수생태계의 척추동물 생물다양성 또는 유전다양성을 비침습적으로 조사하고 연구하는 데 유용하다.

4. 장점

1) 범용성

어류 미토콘드리아 16S rDNA 영역의 PCR 증폭반응을 수행하는데 필요한 프라이머 조합은 모두 16S rDNA 영역 내부의 보존성이 높은 염기서열 부위에 상보적으로 결합한다. 따라서 척삭동물에 속하는 다양한 종들에서 PCR 증폭산물을 성공적으로 얻을 수 있다.

2) 편리성

순방향과 역방향 프라이머의 5' 말단에 Illumina사의 iSeq®, MiSeq®, HiSeq®, NovaSeq® 플랫폼 등의 2×150 bp paired-end sequencing에 사용되는 어댑터와 인덱스가 연결되어 있어 이를 인덱스 PCR (또는 바코드 PCR) 증폭반응 단계를 바로 진행할 수 있다.



그림. AquaAmp® Fish META Universal PCR Kit II의 개념도.

3) 다독성

인덱스 PCR 증폭반응을 수행하고 라이브러리(library)를 제작하고 Illumina사의 차세대염기서열분석(Next Generation Sequencing, NGS) 장치를 사용하여 원본데이터를 생산한 후, paired-end 또는 single-end sequencing, 집산화(clustering) 등과 같은 생물정보학적 분석을 수행하면 16S rDNA 영역 중에서 약 240 bp 내외의 Operational Taxonomic Units (OTUs)가 생성된다.

5. 구성성분

- Fish META Universal PCR Premix II [DNA 중합효소(0.5 U), 1× PCR 완충액, MgCl₂ (4 mM), dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 각각 0.6 μM), 순방향과 역방향 프라이머(각각 0.5 μM), 멸균증류수) (●)
- 멸균증류수(●)
- 양성대조물질(넙치 게놈 DNA 20 ng/μl, 10 μl) (●)

6. 사용법

1) PCR 증폭반응액

이 분석키트에 포함된 Fish META Universal PCR Premix II (●)과 멸균증류수(●)를 얼음 위에서 완전히 녹이고 간단히 원심한다. 추출된 DNA를 이용하여 아래와 같이 PCR 증폭반응액을 만든다.

Reagent	Amount
Fish META Universal PCR Premix II (●)	20 μl
Environmental DNA	1-5 μl
Sterile water (●)	up to 25 μl
Total volume	25 μl

- (1) 이 분석키트를 처음 사용할 때는 동봉된 양성대조물질(넙치 게놈 DNA)(●)을 함께 분석하여 제품의 PCR 증폭반응성을 확인한다. 양성대조물질이 첨가된 PCR 증폭반응에서 예상되는 크기의 단일 PCR 증폭산물(약 320 bp)이 확인되지 않는 경우 제품의 유효기일과 PCR 증폭장치의 이상 여부를 확인한다. 아무런 이상이 발견되지 않으면 아래의 주소로 연락하여 제품을 교환하거나 환불받는다.
- (2) 준비된 환경 DNA의 흡광도 값(A_{260/280})이 1.8-2.0의 범위이고, 농도가 2-50 ng/μl일 때 통상 이상적인 PCR 증폭반응이 일어난다.

2) PCR 증폭반응 조건

아래와 같은 조건으로 PCR 증폭반응을 수행한다.

Step	Temp.	Time	No. cycle
Initial denaturation	98°C	2 min	1
Denaturation	98°C	10 s	15-35
Annealing	55°C	15 s	
Elongation	68°C	30 s	
Final elongation	68°C	5 min	1
Storage	4-8°C	∞	1

- (1) PCR 증폭반응의 성공 여부는 생산된 PCR 증폭산물의 전기영동을 수행하여 확인할 수 있다.
- (2) PCR 증폭반응이 성공적으로 수행되면 약 390 bp 크기의 단일 PCR 증폭산물이 관찰된다. 때로 약 100 bp 이하의 저분자 smearing 밴드가 관찰되지만, 이는 프라이머 이합체(dimers)로 PCR 증폭산물을 정제하여 사용하는 경우 다음 인덱스 PCR (또는 바코드 PCR) 증폭반응 단계에 영향을 미치지 않는다.

3) 인덱스 PCR 증폭반응

생산된 PCR 증폭산물의 전기영동을 통해 단일 PCR 증폭산물이 확인되면 Illumina사의 Nextera XT Index Kit 등을 사용하여 NGS 라이브러리를 제작한다.

7. 기타

- 1) AquaAmp®는 아쿠아진텍(주)의 대한민국 특허청 등록상표이다.
- 2) AquaAmp® Fish META Universal PCR Kit II는 아쿠아진텍(주)의 특허기술(제10-2367357호)을 사용하여 제작되었다. 특허권자의 사전 허가 없이 이 기술을 사용할 수 없으며, 이 분석키트를 제3자에게 재판매하거나 재포장 또는 재가공하여 양도할 수 없다.
- 3) 이 분석키트는 연구용으로만 사용될 수 있으며, 인간, 동식물 등의 진단용으로 사용될 수 없다.